

Dr hab. n. med. Jacek Kurzepa
Katedra i Zakład Chemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Katedra i Zakład Chemii Medycznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin
Tel./fax: 81 448 61 90

Recenzja pracy doktorskiej

Mgr inż. Agnieszki Kozłowskiej

pt. *Biopaliwa jako środowiskowe zagrożenie zdrowia*

– *analiza właściwości mutagennych i cytotoksycznych ekstraktów organicznych wybranych mieszanek biodiesla*

Promotor: Dr hab. Lucyna Kapka-Skrzypczak, Prof. IMW.

Biodiesel to paliwo przeznaczone do napędzania silników wysokoprężnych, potocznie zwanych silnikami Diesla. Zawiera w swym składzie biologiczny komponent w postaci metylowych estrów kwasów tłuszczowych (FAME – ang. *Fatty Acid Methyl Esters*) lub uwodornionych olejów roślinnych (HVO – ang. *Hydrotreated Vegetable Oil*). FAME, otrzymywane jest głównie poprzez transestryfikację olejów roślinnych. HVO to paliwo uzyskiwane na drodze katalitycznej hydrogenacji, podczas której usuwany jest tlen i wiązania nienasycone ze struktur triacylogliceroli. Za stosowaniem biodiesla przemawiają argumenty ekonomiczne np. aktywizacja terenów wiejskich i zagospodarowanie nieużytków rolnych, możliwość częściowego uniezależnienia energetycznego kraju od importu ropy naftowej oraz argumenty ekologiczne jak brak zanieczyszczeń powietrza związkami siarki. Jednakże właściwości techniczne biodiesla takie jak: duża lepkość, podwyższona gęstość, niższa lotność, szybsze zużycie aparatury wtryskowej silników, niska odporność na utleniania mikrobiologiczne w czasie przechowywania czy zwiększona emisja tlenków azotu (NOx), a także zamarzanie przy kilku stopniowym mrozie, stawiają tego rodzaju paliwa w niekorzystnym świetle. Nie bez znaczenia jest wpływ spalin biodiesla na organizmy żywe. Spaliny te stanowią mieszaninę niebezpiecznych związków, które ze względu na skład (duża ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, WWA i ich nitrowych pochodnych, NWWA) posiadają właściwości mutagenne i rakotwórcze. Najnowsze silniki wysokoprężne wykorzystują np. roztwór mocznika wtryskiwany do układu wydechowego w celu usprawnienia neutralizacji toksycznych związków zawartych w spalinach. Mając na uwadze niekorzystny wpływ spalin diesla na organizmy żywe, podjęty przez doktorantkę cel badań, które oceniały właściwości mutagenne organicznych ekstraktów wybranych mieszanek biodiesla oraz analizowały ich oddziaływanie na metabolizm komórkowy, wydaje się jak najbardziej słuszny.

Dysertacja ma typowy układ dla tego typu prac, skład się z 183 stron. Wstęp pracy jest poprzedzony spisem treści oraz wykazem stosowanych skrótów. Na szczególne uznanie zasługuje nienaganna szata graficzna dysertacji, która ułatwia skoncentrowanie uwagi czytelnika na treści zawartej w tekście, nie wywołując frustracji, która mogłaby wystąpić w przypadku

bałaganu panującego na stronach. Zwraca uwagę również nieczęsto spotykana forma umieszczania piśmiennictwa w stopce każdej strony, co na pierwszy rzut oka może wydawać się niepotrzebne, jednak przy czytaniu tekstu znacznie ułatwia natychmiastowe sięgnięcie do artykułu źródłowego. Po wstępie, którego zwieńczeniem jest podanie celu i zakresu pracy, znajduje się rozdział Materiał i metody, następnie Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski. Piśmiennictwo zawiera 246 pozycji wśród których najstarsza jest z 1975 roku, a najnowsza z 2018. Na uwagę zasługuje sięganie przez Doktorantkę do różnorodnych źródeł, nie tylko artykułów opublikowanych w czasopismach (polskich oraz zagranicznych), ale też do książek, aktów prawnych lub niepublikowanych materiałów udostępnionych przez uczelnie. Dysertacja zakończona jest spisem tabel, spisem rysunków oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim

We **Wstępie** Doktorantka w sposób szczegółowy charakteryzuje biopaliwa, metody ich otrzymywania oraz rodzaje testów wykorzystywanych do oceny emisji biopaliw. W dalszej części Autorka charakteryzuje zanieczyszczenia emitowanych biopaliw oraz ich potencjał genotoksyczny, a także testy biologiczne stosowane w badaniach negatywnego oddziaływania ksenobiotyków. Zawarte w tym rozdziale treści w sposób przystępny i wystarczający nakreślają problem badawczy. Całość jest ubogacona rycinami oraz tabelami. Następnie Autorka formułuje **Cel i zakres pracy** którym była ocena właściwości mutagennych wybranych ekstraktów organicznych mieszanek biodiesla z wykorzystaniem mikroplótkowego testu Amesa oraz dokonanie analizy aktywności biologicznej w kontekście ich oddziaływania na metabolizm komórkowy makrofagów mysich RAW 264.7, a w perspektywie – na organizm ludzki. Badania podzielono na 4 etapy; przygotowanie i analiza próbek biopaliw i oleju napędowego, określenie jakościowego i ilościowego składu zanieczyszczeń, badania efektu mutagennego organicznych ekstraktów przy użyciu krótkoterminowego testu Amesa oraz badania cytotoksyczności organicznych ekstraktów biopaliw za pomocą testu MTT z wykorzystaniem linii makrofagów mysich. W rozdziale **Materiał i metody** Doktorantka na wstępie podaje, iż badania sfinansowano w ramach projektu badawczego NCN, w którym Autorka jest głównym wykonawcą. Przedmiotem badań było sześć rodzajów paliw, wśród których wchodziły; olej napędowy, metylowe estry kwasów tłuszczowych, mieszanki ww. związków w różnych proporcjach oraz mieszanka w składzie uwodornionych olejów z olejem napędowym. Próbki ze spalin diesla i mieszanek biodiesla pobierano na stanowisku do wytwarzania i badania spalin na hamowni podwoziowej w Laboratorium Badań Emisji Spalin Instytutu Badań i Rozwoju Motoryzacji BOSMAL w Bielsku Białej. Po uzyskaniu ekstraktów z analizowanych spalin dokonano oznaczenia 13 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych metodą HPLC zgodną z normą PN-Z-04240-5:2006. Zawartość wybranych nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych wykonano metodą chromatografii gazowej z detektorem mas. Do badania mutagenności zastosowano test Ames a i wykorzystano szczepy bakterii Salmonella typhimurium TA98, TA100 i YG1024. Doktorantka charakteryzuje następnie procedury zastosowane w trakcie oceny cytotoksyczności organicznych ekstraktów mieszanek biodiesla. W tym przypadku zastosowano wspomniane poprzednio mysie makrofagi RAW264.7, a jako test

wykorzystano test zahamowania wchłaniania błękitu tryptanu oraz test MTT. Rozdział Materiał i Metody nie budzi merytorycznych wątpliwości. Na uwagę zasługuje zróżnicowanie zastosowanych metod badawczych zastosowanych przez Doktorantkę oraz bardzo szczegółowe ich opisanie, wraz z umieszczeniem rycin i zdjęć pokazujących poszczególne etapy doświadczenia. Następnie Autorka przedstawia uzyskane **Wyniki**. Przeprowadzone badania wykazały, że potencjał mutagenny badanych ekstraktów biopaliw oraz czystego oleju napędowego był wysoki, a najwyższym z nich charakteryzowały się ekstrakty zawierające 15% i 30% biokomponentu rzepakowego. Test Ames wskazał na obniżenie aktywności mutagennej mieszanek z dodatkiem biokomponentów uwodornionych olejów roślinnych, w porównaniu do oleju napędowego. Niemniej jednak stwierdzono, że mieszanka ta zawiera w swoim składzie znaczną ilość amin aromatycznych i nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych o działaniu bezpośrednim (bez dodatku frakcji mikrosomalnej S9) na bakterie *Salmonella typhimurium* szczepu YG1024, które mogą stanowić zagrożenie dla ludzi ze względu na łatwość wchłaniania trucizn przez układ oddechowy i możliwość wystąpienia szybkiego działania toksycznego. Najniższą mutagennością dla organizmów żywych charakteryzował się biodiesel z 7% zawartością biokomponentu rzepakowego. Natomiast cytotoksyczność ekstraktów organicznych z biodiesla dla komórek makrofagów mysich wzrastała wraz z zawartością biokomponentu w składzie mieszanki. W podsumowaniu, Autorka stwierdziła, że narażenie na spaliny z biodiesla może prowadzić do powstawania mutacji w komórkach, co z kolei w konsekwencji może potencjalnie przyczyniać się do indukcji procesu nowotworowego.

W **Dyskusji** Autorka w sposób syntetyczny dokonuje analizy otrzymanych wyników na tle danych literaturowych, tłumacząc pojawiające się niekiedy rozbieżności pomiędzy wynikami badań różnych autorów. W rozdziale **Wnioski** Doktorantka w sposób klarowny podsumowuje uzyskane wyniki w sposób wyczerpujący odpowiadając na postawione pośrednio cele pracy.

W podsumowaniu warto zaznaczyć, iż praca pomimo swojej obszerności, jest dobrze przygotowana pod względem edytorskim, stanowi zwartą całość, napisana jest przystępnym językiem oraz jest nienaganna pod względem graficznym, co znacznie ułatwia jej czytanie.

Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na kilka drobnych niejasności, na które natknąłem się podczas czytania dysertacji.

- Rysunek 2 przedstawiający cykl biodiesla jest spolszczoną wersją ryciny ogólnodostępnej w Internecie, dlatego też w Autorka powinna podać w legendzie adres źródła elektronicznego ewentualnie z adnotacją „w modyfikacji własnej”, a nie jedynie stwierdzenie „opracowanie własne”.
- Numeracja piśmiennictwa podana w tekście i stopkach stron nie pokrywa się z numeracją podaną na końcu dysertacji. Wynika to z tego, iż powtarzające się pozycje pojawiające się w stopkach za każdym razem uzyskują nowy numer. Jest to pewną niedogodnością podczas



sprawdzania, czy wszystkie pozycje literaturowe zawarte w rozdziale Piśmiennictwo są umieszczone w tekście.

- Rysunek 7 zawiera schemat przygotowania rozcieńczeń na płytce 24-dołkowej, a nie jak podano na płytce 96-dołkowej.

Wszystkie przedstawione uwagi nie mają wpływu na ogólną bardzo wysoką ocenę dysertacji, która w konsekwentnie zaplanowanych i przeprowadzonych badaniach osiągnęła postawiony cel. Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy jak i dorobek naukowy Doktorantki świadczą o dojrzałości naukowej mgr inż. Agnieszki Kozłowskiej i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora. Dysertacja pt. *Biopaliwa jako środowiskowe zagrożenie zdrowia – analiza właściwości mutagennych i cytotoksycznych ekstraktów organicznych wybranych mieszanek biodiesla* stanowi ciekawy i istotny wkład do badań nad wpływem spalin na powstawanie mutacji komórkowych, mogących w konsekwencji przyczyniać się do indukcji procesu nowotworowego. Rozprawa odpowiada warunkom stawianym pracom doktorskim i spełnia wymogi stawiane pracy doktorskiej określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz 595) z późniejszymi zmianami. Dlatego też wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Wsi im. Witolda Chodzki w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na zarówno wartość merytoryczną pracy jak i bogaty warsztat badawczy wnioskuję o wyróżnienie niniejszej dysertacji.

Lublin, 18.05.2018

Kierownik
Katedry i Zakładu Chemii Medycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
dr hab. n. med. Jacek Kurzepa